

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 8 月 2 1 日
Date of Application:

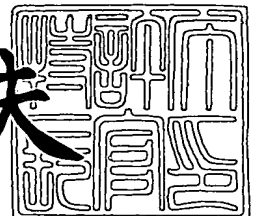
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 2 9 8 0 2 7
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 2 9 8 0 2 7]

出 願 人 東 洋 紡 績 株 式 会 社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 1 月 1 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 0 0 7 2 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 CN03-423
【提出日】 平成15年 8月21日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01J 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内
 【氏名】 京 基樹
【発明者】
 【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 1 0 番 2 4 号 東洋紡績株式会社内
 【氏名】 宝田 裕
【特許出願人】
 【識別番号】 000003160
 【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社
 【代表者】 津村 準二
【代理人】
 【識別番号】 100123423
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 柿澤 紀世雄
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 204309
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

金属基板上に形成されたアレイ部分を有し、スポットの場所を記したマーカーが備えられていることを特徴とするバイオチップ

【請求項 2】

上記金属基板が、金薄膜がコーティングされた透明基板である請求項 1 記載のバイオチップ

【請求項 3】

上記金属基板上のアレイが表面プラズモン共鳴法の測定用である請求項 1 ～ 2 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 4】

上記金属基板上のアレイが表面プラズモン共鳴イメージング法の測定用である請求項 1 ～ 3 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 5】

マーカーが判別可能な文字及び／または数字である請求項 1 ～ 4 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 6】

単分子層でパターン化されているマーカーを有する請求項 1 ～ 5 いずれか記載のバイオチップ

【請求項 7】

マーカー部分にコーティングされた分子の平均分子量と、周囲の部分にコーティングされた分子の平均分子量の比が 0.5 以下もしくは 2 以上である請求項 1 ～ 6 記載のバイオチップ

【書類名】明細書

【発明の名称】 バイオチップ

【技術分野】

【0001】

本発明は、スポットの位置の判別を容易とするマーカーを有する金属基板バイオチップに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、生体分子の相互作用解析、発現分子のプロファイリング、もしくは診断に用いるバイオチップが注目を集めている。基板上に生体分子が固定化されることで操作が容易になり、場合によっては非常に多くの物質の相互作用を同時に解析することができる。

一般的なバイオチップとしてDNAチップが挙げられる。DNAチップはDNA分子を固体基板に固定化したもので、DNA-DNA相互作用の観察に用いられる。最近は分子の集積度が非常に高くなっており、一回の測定から得られる情報量も増加している。しかし、結合の検出には蛍光や化学発光、放射線同位体などのラベル方法が必要である。従って、ラベルの困難な蛋白や糖などの生体分子の相互作用には適さない。

【0003】

ラベルフリーの相互作用解析方法として、表面プラズモン共鳴（SPR）法、エリプソメトリ法、和周波発生法などの光学的検出方法が注目を浴びている。中でもSPR法を応用したSPRイメージング法は二次元領域の相互作用を観察することが可能であり、注目を浴びている。すなわち、チップ全面に偏光光束を照射し、その反射光をCCDカメラで撮影する手法である。金属基板チップ上にアレイを作製すれば、SPRイメージング法による多点での相互作用が可能となる（特許文献1）。

【0004】

しかし、SPRイメージング法の光学系は複雑であり、CCDカメラはチップの背面から撮影するため、CCDカメラにはチップ表面に形成したパターンが反転して映しだされる。従って、サンプルを固定化した場所の特定が困難となる。この問題を解決するため、決められたパターンで表面に固定化する手法が取られている（非特許文献1, 2）。このようにパターンで表面に固定化するとどの分子が相互作用したか判別が容易となる。しかし、パターンを形成するためには一つのサンプルを複数のスポットに固定化する必要があり、測定のスループットに限られる問題点があった。

本発明はチップ上にスポットの位置を特定するマーカーを備えることで、多点での相互作用解析に適したバイオチップを実現する。

【0005】

【特許文献1】 米国特許 6127129 号明細書

【非特許文献1】 Nelson et. al. Anal. Chem. 73 (2001) 1-7

【非特許文献2】 Smith et. al. J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 6810-6811

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、スポットの位置が判別可能な金属基板からなるバイオチップを得ることにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは鋭意検討した結果、以下に示す手段を用いたバイオチップとすることにより、上記課題を解決できることを見出した。

1. 金属基板上に形成されたアレイ部分を有し、スポットの場所を記したマーカーが備えられていることを特徴とするバイオチップ

2. 上記金属基板が、金薄膜がコーティングされた透明基板である 1 記載のバイオチップ
3. 上記金属基板上のアレイが表面プラズモン共鳴法の測定用である 1～2 いずれか記載のバイオチップ
4. 上記金属基板上のアレイが表面プラズモン共鳴イメージング法の測定用である 1～3 いずれか記載のバイオチップ
5. マーカーが判別可能な文字及び／または数字である 1～4 いずれか記載のバイオチップ
6. 単分子層でパターン化されているマーカーを有する 1～5 いずれか記載のバイオチップ
7. マーカー部分にコーティングされた分子の平均分子量と、周囲の部分にコーティングされた分子の平均分子量の比が 0.5 以下もしくは 2 以上である 1～6 記載のバイオチップ

【発明の効果】**【0008】**

本発明により得られたバイオチップは、光学的検出法による金属基板上の相互作用において、マーカーによってスポットの位置を容易に知ることが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】**【0009】**

本発明のバイオチップは金属基板に形成されたアレイ部分を有している。金属基板としては金薄膜がコーティングされた透明基板であることが好ましい。なぜならば、SPR、エリプソメトリ、和周波発生法などの光学的検出方法に適しているからである。また、末端に官能基を有するアルカンチオール類、ジスルフィド類などを用いることで、金表面に金-硫黄結合により自己組織化表面を形成し、表面に官能基を導入することができるため好ましい。官能基は特に限定されるものではないが、例えばカルボキシル基を有するアルカンチオールを用いることで金表面にカルボキシル基が導入され、水溶性カルボジイミドとN-ヒドロキシスクシンイミドによって活性化した後、アミノ基を有する物質を表面に固定化することが可能である。

【0010】

金薄層をコーティングする方法は特に限定されるものではなく、蒸着法、スパッタリング法、イオンコーティング法などが挙げられる。一般的には金の剥離を抑制するため、金の下にクロムもしくはチタンが1～10 nmコーティングされる。金の厚みは限定されるものではないが、30～100 nmコーティングされるのが一般的である。

透明基板の素材は特に限定されるものではなく、ガラスやポリカーボネート、ポリオレフィンなどのプラスチック類が挙げられる。金属基板上のアレイ部分とは、分子を規則正しく配列して基板に固定化している、もしくは固定化可能な部分を言う。

【0011】

光学的検出方法としては表面の屈折率変化に敏感なSPR法が好ましい。SPR法はラベルフリーかつリアルタイムである測定方法であり、相互作用解析法として実績がある。中でもSPRイメージング法は二次元の領域の相互作用を観察できるためさらに好ましい。アレイを作製すれば、多点での相互作用が測定できる。

【0012】

本発明のバイオチップはアレイ部分のスポットの場所を記したマーカーが備えられていることが特徴である。マーカーを備えていることで、アレイ上に固定化された物質がどこにあるのかを容易に判別できる。特に光学的検出方法としてSPRイメージング法を用いる場合、チップの背面からCCDカメラで撮影する場合が一般的である。背面から撮影するとチップ上のパターンが反転して映るために、場所が判別しにくい。マーカーが存在することで、スポットの場所を容易に特定できる。

【0013】

マーカーは一つであっても、多数存在してもよく、マーカーの形状もどのようなもので

もよい。ただし、アレイの行と列を容易に判別するためにマーカーの形状は判別可能な文字及び／または数字であることが好ましい。例えば、固定化するサンプルは市販の96穴プレートや384穴プレートに用意する場合、プレートに記載された行と列の文字数字をそのまま反映させることが考えられる。96穴プレートの場合であると、縦軸にAからHまでのアルファベット文字、横軸に1から12まで数字が記載される場合が考えられる。

また、アレイは市販の96穴プレートや386穴プレートに対応させるため、 8×12 のスポット部、 12×16 のスポット部もしくは 16×24 のスポット部をもつことが好ましい。

【0014】

マーカーの導入方法としては、検出系で検出可能な方法であればその方法に限定されるものでないが、例えば、マーカーの部分のみ金属の蒸着を行わない、マーカーの部分のみ金属の厚みを変える、マーカーの部分またはマーカー以外の部分の金属表面上もしくは基板-金属層間にポリマー、有機物質、無機物質等を付着させるか他の部分とは異なる物質を付着させる、等の方法が挙げられる。

【0015】

マーカーの部分またはマーカー以外の部分にポリマー、有機物質、無機質等を付着させる方法としては、マスクして蒸着する、マスクしてコーティングする、凸版やインクジェット法等による印刷を行う、全面にコートした後に光・レーザー・放射線照射等により付着物を分解除去するか変質させて不要部分を除去する、不要部分を除去した後さらに他の物質を付着させる、などの方法が挙げられ、適宜単独もしくは組み合わせることができる。金属表面上に付着させる場合には、金属層を設けた基板に上記方法によってマーカーを設けることが出来る。基板-金属層間に付着させる場合には、基板上に上記方法によってマーカーを付着させた後に金属層を設けることが出来る。

【0016】

ポリマー、有機物質としては金属、基板に付着可能であり、金属上に付着させる場合には測定液を流した際に流失されないものであれば問題はなく、例えばインキ、塗料等に用いられるポリマーや有機物質、これらの組成物が挙げられるが、金と強固に結合可能である分子内にチオール、スルフィド、ジスルフィド等のイオウを含有する有機物質、ポリマーが好ましく用いられる。

【0017】

また、マーカーと他の部位とのチップ表面での高さの差は 3μ 以下であることが好ましい。より好ましくは $1 \mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは 100 nm 以下、特に好ましくは 50 nm 以下である。さらには、マーカーは単分子層で導入されていることが好ましい。チップ表面に $3 \mu\text{m}$ を越える凹凸があると、分析対象物質を含んだ溶液をチップ表面に曝す際に、表面の流れが悪くなり、相互作用のKineticsを評価するには好ましくなく、分子レベルでの凹凸である方が好ましいからである。分子レベルの凹凸はSPRイメージング法などの光学的検出方法によって十分に判別可能である。

なお、表面の凹凸は、触針式や非接触の表面粗さ計、干渉顕微鏡、トンネル顕微鏡、SPR角度からの計算、断面でカットして観察する等、その凹凸の規模により測定して決定することが出来る。

【0018】

さらに、マーカー部はスポット部を形成する際に同時に形成されることが好ましい。マーカー部とスポット部のどちらかを予め形成させると、スポットのパターンが制限されたり、位置ズレが生じる場合がある。なお、ここで同時というのは、時間的に完全な同時でなくとも、同一工程もしくは基板を移動させずに引き続き行われるものであればかまわない。マーカー部とスポット部を同時に形成する方法としては、金属層を設ける際にマスクして金属の蒸着等を行いマーカー部とスポット部を設ける、金属層上にスポットティングによりスポット部を設ける際にマーカー部も設ける、バックグランド部にあたる部分の金属面を表面処理してスポット部を設ける際にマーカー部分も設けるなどの方法が挙げられる。

【0019】

具体的には、金属層上にスポッティングによりスポット部を設ける際にマーカー部も設ける場合には、例えば、金属上に自動スポッター等でスポッティングを行い、その中で同一か別の物質を用いてマーカーを設ける。スポッティングおよびマーカーは、ピンやペンによる方法、インクジェットによる方法等が挙げられる。また、スポッティング工程後レーザー等を用いて基板にマーカーを刻印してもかまわない。

【0020】

バックグランド部にあたる部分の金属面を表面処理してスポット部を設ける際にマーカー部分も設ける場合には、例えば、金属面全面にバックグランド部にあたる親水性化合物等をコートし、その後にスポット部から親水性化合物等を除去するが、その際にマーカー部の親水性化合物を除去する方法が挙げられる。

この方法の最も好ましい例としては、既知の光リソグラフィによってアルカンチオールを酸化する方法（特許文献1に記載）がある。すなわち、分子を固定化するスポット部分に紫外線照射を行い、周囲部分とスポット部分を区別する手段である。この方法でスポット部分だけでなく、マーカー部分もパターン化することができる上、単分子層でパターン化できる。

【0021】

ただし、SPRイメージング法で分子レベルの凹凸を識別するには、固定化されている分子の分子量が異なっている必要がある。チップの表面層において異なる屈折率を有する厚みを変化させなければ、違いを識別できないからである。

具体的には、マーカー部分に結合した分子の平均分子量と、周囲部分に結合した分子の平均分子量の比が0.5以下もしくは2以上であることが好ましい。結合される分子が分子量分布のある高分子の場合、平均分子量として、GPCによる重量平均分子量が選択される。

【実施例】

【0022】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【0023】

[実施例]

(ステップ1)

アルキル鎖の炭素数が2であり、末端の官能基がチオール基であるPEGチオール（日本油脂製SUNBRIGHT MESH-50H）を1mMの濃度で7mlのエタノール：水＝6：1の混合溶液に溶解させた。PEGチオールの分子量は5000であり、親水性が非常に高い。また、PEGの末端はメトキシ基であり、反応性をほとんど有さない。

【0024】

18mm四方、1mm厚のSF10ガラススライドにクロムを3nm蒸着し、金を45nm蒸着した金蒸着スライドを、上記PEGチオール溶液に3時間浸漬させ、金基板全体にPEGチオールを単分子層で結合させた。

【0025】

(ステップ2)

このスライドの上に図1に示すフォトマスク（クロム面が上で示されている）を載せ、500W超高圧水銀ランプ（ウシオ電機製）で2時間照射し、照射部のPEGチオールを除去した。フォトマスクにはアレイ部分とマーカー部分が備えられている。アレイ部分のスポットは96個存在し、96穴プレートを反映した形でマーカーが存在する。すなわち、縦軸はAからHの8行、横軸は1から12の12列となっている。この場合、フォトマスクはクロム面を下にして、金表面に置かれる。従って、紫外線の照射により、左右反転して金表面にパターン化される。SPRイメージング法では、チップ背面から撮影するため、結果的に文字と数字は正しい方向に映しだされる。

【0026】

(ステップ3)

次に分子量 176 の 7-カルボキシー-1-ヘプタンチオール (7-CHT: 同仁化学研究所) の 1 mM 溶液中にスライドを 1 時間浸漬し、固定化部に 7-CHT を単分子で固定化した。

こうして得られたバイオチップはマーカー部とアレイ部には 7-CHT が、周囲部分には PEG チオールが固定化されており、分子量の比は 0.035 である。また、このバイオチップは単分子でパターン化されている。

このバイオチップを SPR イメージング機器 (東洋紡績製) にセットして、ミリ Q 水を流した。その際の SPR 画像を図 2 に示す。このように縦軸に文字が、横軸に数字がはっきりと読み取ることができる。

【0027】

この文字部とバックグラウンド部の SPR 角を測定した。SPR 角とは反射光強度が極小になる角度のことを言う。文字部の SPR 角は 53.80° 、バックグラウンド部の SPR 角は 54.06° と測定され、SPR 角の変位は 0.26° であった。

Hansen (J. Opt. Soc. Am. 1968, 58, 380-390) による N 相の Fresnel 式に基づいて、830 nm の光に関して、層の厚みの計算を行った。SF10 ガラスの屈折率 1.710、金の $n=0.155$ 、 $k=5.1634$ 、厚み 45 nm、PEG 層の屈折率 1.40、水の屈折率 1.33 として計算を行ったところ、 0.26° の変位は 11 nm の厚みの差に相当した。50 nm 以下であるため、チップ上の流れへの影響は非常に少ないと推測される。

こうして得られたバイオチップには 96 穴プレートに用意したサンプルが固定でき、スポットの位置が容易に参照可能である。

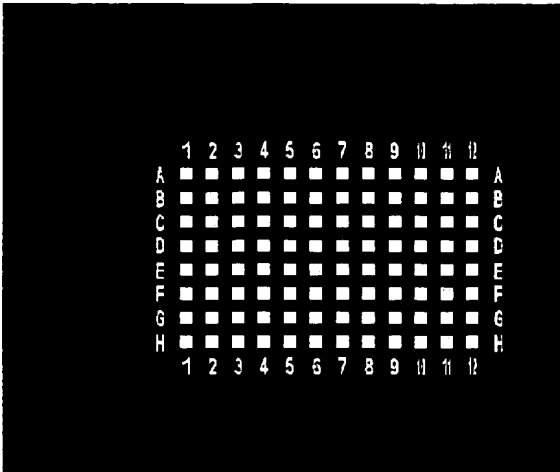
【図面の簡単な説明】

【0028】

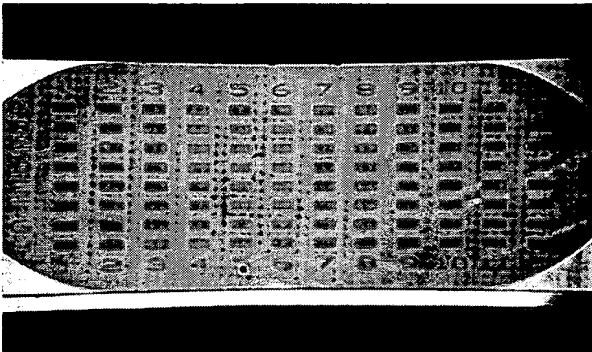
【図1】 実施例で使用したフォトマスク

【図2】 実施例による SPR イメージング像

【書類名】図面
【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 スポットの位置が判別可能な金属基板からなるバイオチップを得ることにある。特に表面プラズモン共鳴イメージング法に適したバイオチップを得る。

【解決手段】 金属基板上に形成されたアレイ部分を有し、スポットの場所を記したマーカが備えられていることを特徴とするバイオチップ。好ましくはマーカは識別可能な文字もしくは数字である。さらに好ましくは単分子レベルでマーカがパターン化されている。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 2 9 8 0 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 3 1 6 0]

| | |
|----------|--------------------------|
| 1. 変更年月日 | 1 9 9 0 年 8 月 1 0 日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号 |
| 氏 名 | 東洋紡績株式会社 |